

Japanese Publication for Patent No. 7954/1972
(Shou 47-7954)

The following is a partial English translation of exemplary portions of non-English language information that may be relevant to the issue of patentability of the claims of the present application.

The present invention provides an economical and industrially advantageous method of producing the ubiquinone. More specifically, the present invention provides a method of producing the ubiquinone, the method comprising incubating *Rhodopseudomonas capsulatus* in a large quantity, and extracting the ubiquinone with an organic solvent from incubated and collected cells of *Rhodopseudomonas capsulatus*.

⑤Int.Cl.
C 12 d
C 07 c
A 61 k

⑤日本分類
36 (2) D 33
16 C 44
80 A 82

日本国特許庁

⑩特許出願公告

昭47-7954

⑩特許公報

④公告 昭和47年(1972) 3月7日

発明の数 1

(全5頁)

1

④ユビキノンの製造法

①特 願 昭43-3130
②出 願 昭43(1968)1月19日
③発 明 者 平山修
京都市左京区岩倉長谷町675
同 小林達治
京都市左京区浄土寺真如町137
同 持田晃一
寝屋川市東香里園町8の10
⑦出 願 人 財団法人生産開発科学研究所
京都市左京区下鴨森本町15

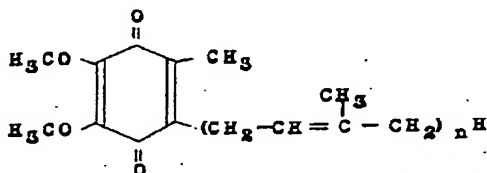
図面の簡単な説明

第1図は本発明方法により得たるユビキノンの紫外外部吸収スペクトルを示すものであり、第2図は同じく赤外部吸収スペクトルを示すものである。

発明の詳細な説明

本発明は、ロドシユードモナス・カプシユラタス(Rhodopseudomonas capsulatus)菌体(微工研菌寄第879号)を利用せるユビキノンの製造法に関するものである。

ユビキノンは下記の一般式で示されるキノン核の6位にイソブレン側鎖をもつ2・3-ジメトキシ-5-メチル-1・4-ベンゾキノン群の総称でイソブレン単位数がnが6-10の公知化合物である。



上記ユビキノンは細胞内に於ける末梢電子伝導系の必須成分として重要なものであることは既に報告されており、またその合成が極めて困難なことも周知の事実である。

因みに、現在では専ら生合成されたユビキノンを

2

を牛、馬、豚、鯨等の心臓その他の組織やトルラ酵母、ペリシリウム等より抽出されているが、その収率は非常に低く採算のとれるものではない。

本発明は、上記ユビキノンを工業的に有利に製造できる方法を提供せんとするものであり、詳しくはロドシユードモナス・カプシユラタス(Rhodopseudomonas capsulatus、以下略)を多量に培養し、集菌したる該培養菌体より有機溶媒によつてユビキノンを抽出分離する方法である。

先ず本発明に於て用いるロドシユードモナス・カプシユラタスについてその性質の概要並びに菌学的性質を述べる。

ロドシユードモナス・カプシユラタスはアシオロダージェエ(Athiorhodaceae)一紅色無硫黄細菌一科に属し、本発明者等の研究に依れば熱帯、亜熱帯の殆んど溜水状態の場所例えば水田、溝、下水、河川、湖、海、温泉等に生存していることが認められている。

本発明者等が分離、採集して本発明に於て用いた菌株の菌学的性質について述べると、

a. 形態的特徴

一本の鞭毛を持つて極めて運動性に富む、普通には短杆状菌(幅0.5μ×長さ1.0μ)であるが、培養液の種類、培養期間によつては長杆状菌(幅0.5μ~0.7μ×長さ6.0μ)のものがでてくる。即ち多形現象を示す。

b. 生育条件

各種培地における生育状態(嫌氣的照明条件下)

肉 汁	+
ペプトン水	+++
馬鈴薯培地	-
シオサルフェイト (Thiosulfate)	-
アラニン (Alanine)	+
リユーシン (Leucine)	-
アスパラギン (Asparagine)	+

アスパラギン酸	—
グルタミン酸	+
酒石酸	—
クエン酸	—
グルタル酸	+
酢酸	+
プロピオン酸	+++
乳酸	++
コハク酸	+
リンゴ酸	+
酪酸	++
クロトン酸	+
ビルビン酸	++
エタノール	—
マニトール (Mannitol)	—
ソルビトール (Sorbitol)	—
ブドウ糖	+
マンノース (Mannose)	—
果糖	+
グリセロール (Glycerol)	—

〔いずれも基質について0.2%濃度を使用〕

注：+++ → 生育良好
 + → 生育可能
 — → 生育不可能

c. 生理的性質

- (1) 最適生育条件
pH 7.2 温度 27℃、嫌氣的照明 (1000 lux)
- (2) 生育しうる条件
pH 6.0~8.0、温度 23~39℃、好氣~嫌氣、暗黒条件~照明条件
- (3) グラム染色性
陰性
- (4) 抗酸性
アリ
- (5) インドールの生成
ナシ
- (6) 硫化水素の生成
ナシ
- (7) 窒素ガスを固定する能力
アリ

(8) カタラーゼの生成

アリ

(9) セラチンの液化

ナシ

5 (10) 澱粉の加水分解

ナシ

(11) 還元型メチレンブルー、還元型メチル (又はベンジル) バイオロジエン色素の酸化能力

10 アリ

(12) バイオティン (Biotin)、サイアミン (Thiamin)、ニコチン酸を生長因子として要求する。

以上の通りである。

15 従つて、この菌は (バージェイ・マニユアル・オブ・デターミナティブ・バクテリオロジイ7版) によつてアシオローセ科ロドシユードモナス属カプシユラタス種と同定される。

次に上述の如きロドシユードモナス・カプシユラタスは、安価な合成培地、有機酸・アミノ酸糖を含む工場廃液、有機酸の発生した尿廃水等を培養基として接種し、嫌氣的雰囲気・照明条件下に於いて1~7日間培養すれば活性ある菌体を大量に得ることができる。

25 今培地の一例を示せば次の如き組成のものが代表例として挙げられる。

即ち、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NaCl 、 CaCl_2 、 NaHCO_3 等の混合溶液に生長因子としてニコチン酸、ピチオン、ビタミンB₁、P-アミノベンゾイックアシド等を極微量加え、酸に低級脂肪酸をNa塩として全体量の0.3~0.5%加えpH 7.0程度に調節した合成培地である。

また、澱粉工業廃液に例えばバチルス・メガテリウムを接種し、好氣的雰囲気、に於て約1日培養・増殖せしめ有機酸、アミノ酸、糖等を蓄積せしめたものも培地として好適である。

尚、上述の如き培地を用いて培養するに当つては特公昭42-11979光合成細菌の大量培養方法に見られる如く、密閉照明式培養槽を用い、約3000~10000 luxの照明下、攪拌下に行なえば収率よく菌体を収獲することができる。

次に上述の如くして大量に培養したロドシユードモナス・カプシユラタス菌体を連続式遠心分離機 (例えばシャープレズ・タイプのもの) を用い

て集菌して、水分約80%程度の菌体濃縮物(湿菌)とし、これを凍結融解した後これを一旦抗酸化剤の存在下でけん化後又は直接に、有機溶媒例えばクロロホルム、エーテル、石油エーテル、ヘキサン、シクロヘキサン、イソオクタン等にて抽出すれば目的物ユビキノンは抽出され、有機溶媒を除去すれば赤色を呈した粗製ユビキノンを得ることができる。またメタノール、エタノールなどの極性溶媒で抽出した後さらに上記無極性溶媒で再抽出を行えば収率を上げることができる。

尚、抽出処理に於ける有機溶媒の量、攪拌時間等は溶媒の種類、温度等により適宜選択されることは当然である。

次に上記の粗製ユビキノンをアルミナ、ゲイ酸、ゲイ酸マグネシウム、ゲイ酸アルミニウム等の吸着剤を用いるカラムクロマトグラフィーによつて精製すれば、赤外吸収スペクトル、紫外吸収スペクトル等によりユビキノンの標色と一致する精製ユビキノンを得ることができる。

以上の如き構成を本発明方法に依れば、合成が極めて困難でまた天然物よりの抽出収率が極めて低いとされているユビキノンを、安価な培養基を用いて容易に大量培養が可能なロドシユードモナス・カプシユラタスを原料として収率よく製造できるので非常に有利である。また、ロドシユードモナス・カプシユラタスを培養後の培養液のB、O、D値は低下するので澱粉工業廃液、し尿廃水等を培養基とする場合には排水に関する公害問題も解決することができ有意義である。

次に本発明の詳細を実施例により説明する。

実施例 1

水1 l に対し CH_3COONa 4 g、
(NH_4)₂ SO_4 3 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、 NaCl 0.5 g、 CaCl_2 0.5 g、 NaHCO_3 0.2 g、酵母エキス 0.01 g を混合し pH 7.0 に調節して培養液とし、200 l の密閉照明式培養槽に移し次に培養槽の全溶液当り 20% の生育のよいロドシユードモナス・カプシユラタス培養液を植菌する。しかる後 37℃、10000 lux の照明下で嫌氣的零環境にて 3 日間培養した連続遠心分離機により 10000 r. p. m で集菌したロドシユードモナス・カプシユラタスの湿菌 550 g (水分 80% 含有) を採取した。

次に得られた湿菌を凍結、融解しクロロホルム

メタノール混液 1:1 で抽出を繰返した後、水を加えて振盪し水層の部分を除き、クロロホルム層を濃縮した。

次いで濃縮物をペプタンに溶解し、けい酸を充填したカラムに吸着させた後、ペプタン、クロロホルム 1:1 混液で溶出しユビキノンの画分を得た。本画分を減圧下で蒸発乾固し、黄色のユビキノ 15.4 mg を得た。このものは薄層クロマトグラフィー、紫外吸収スペクトル、赤外吸収スペクトルからユビキノ 50 であることを確かめた。尚、収量は乾燥菌体 1 kg 当り 1.4 g であった。

実施例 2

水道水 1 l に対し ペプトン 5 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、 NaCl 0.2 g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g、酵母エキス 0.02 g を混合し pH 7.0 に調節して培養液としロドシユードモナス・カプシユラタスを実施例 1 と同一の密閉照明式培養槽に移して 27℃、10000 lux の条件で 5 日間培養した。次に遠心分離機で集菌し培養液 200 l からロドシユードモナス・カプシユラタスの湿菌 432 g を得た。得られた菌体を凍結融解しヘキサンで抽出を繰返し、ヘキサン抽出液は減圧濃縮した後、けい酸マグネシウムを充填したカラムに吸着し、7% エーテル・ヘキサンで溶出しユビキノンの画分を得た。本画分を減圧下で蒸発乾固してユビキノ 95 mg を得た。このものは実施例 1 と同様にしてユビキノ 50 であることを確認した。尚、収量は乾燥菌体 1 kg 当り 1.1 g であった。

実施例 3

澱粉工場廃液 270 l にバチルス・メガテリウムを植菌し好氣的に 20 時間培養して有機酸、アミノ酸、糖を蓄積せしめた後 pH 7.0 となし、口過して不溶物を除去し、密閉照明式培養槽に移しロドシユードモナス・カプシユラタスを澱粉廃液の 20% 植菌する。しかる後 10000 lux の照明下で嫌氣的零環境にて 5 日間培養した。連続遠心分離機で 10000 r. p. m で集菌し湿菌 (水分 80% 濃縮物) 470 g を得た。次にここに得られた菌体濃縮物に 10% メタノール性カリとピロガロールを加えて 65℃ に保ち、窒素気流中で 30 分間攪拌した。次いでこれを冷却後石油エーテルで抽出を繰返し、石油エーテル層を水洗した後、無水芝硝で乾燥し黄色の油状物 1.4

0 mgを得た。

これを少量の石油エーテルに溶解し、アルミナを充填したカラムに吸着せしめ10%エーテル・石油エーテル混液で溶出しユビキノンを画分を得、実施例1と同様に処理確認した。収量は澱粉廃液270 lからユビキノンを50を64 mgを得た。

実施例 4

し尿を好氣的条件下で24時間曝気して有機酸の豊富なし尿処理液とした後、pH7.0に調整し口過して不溶物を除去したものにロドシユードモナス・カプシユラタスを20%の割合に植菌し実施例1と同様に照明下嫌氣的に5日間培養して菌体を集積させ遠心分離(10000 r.p.m)して集菌した後65℃で減圧乾燥し乾燥菌体としてし尿200 lから115 gを得た。

次にこの菌体濃縮物にメタノールを加え、かき回しでピロガロール存在下に窒素気流中で30分間環流した後、急冷し、20%の割合にイソオクタンを加えて3回抽出した。イソオクタン層を集

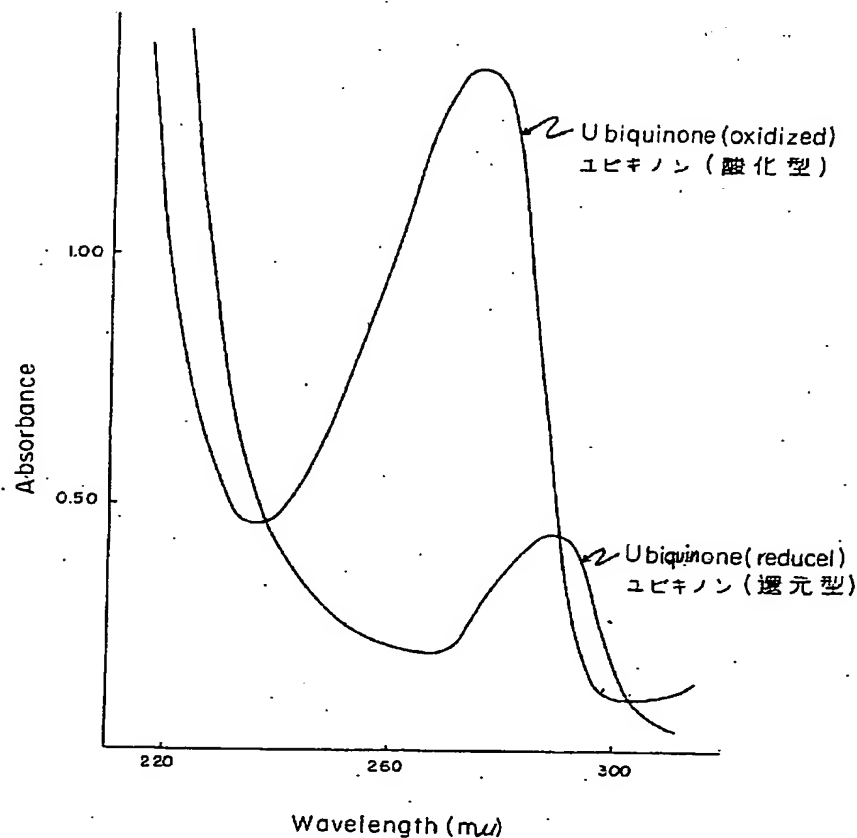
めて水洗後、無水芝硝で脱水し減圧濃縮して油状物220 mgを得た。これに少量のイソオクタンを加えて溶解し、口過した。口液をけい酸を充填したカラムに吸着させ、クロロホルム・イソオクタン1:1の混液で溶出しユビキノンを画分を得たこれを減圧下で濃縮し黄色の結晶91 mgを得ることができた。このものは実施例1と同様の方法でユビキノンを50であることを確認した。尚収量は乾燥菌体1 kg当り790 mgであつた。

尚、実施例1乃至4により得たるユビキノンを50はいずれも第1図及び第2図に見られる如く紫外外部吸収スペクトル、赤外吸収スペクトルによつて目的物であることを確認できた。

特許請求の範囲

- 15 1 ロドシユードモナス・カプシユラタス (*Rhodopseudomonas capsulatus*) (微工研菌寄第879号) を培養後、集菌し該菌体より有機溶媒でユビキノンを抽出することを特徴とするユビキノンを50の製造法。

第 1 図



(5)

特公 昭47-7954

第 2 図

